

Citation 7

(Translation of Filing particulars and Abstract)

Japanese Patent Application Laying Open (KOHYO) No. 10-501128  
laid open to the public February 3, 2000

Japanese Patent Application No. 8-500737

International Application No. PCT/SE95/00585  
filed May 24, 1995

International Publication No. WO95/33067  
published December 7, 1995

Priority(ies) claimed: Swedish Application No. 9401806-6  
filed May 26, 1994

Applicant(s): Pharmacia AB, Sweden

Inventor(s): S. STAHL, Swedish citizen

Title of Invention: METHOD AND MEANS FOR THE PRODUCTION OF HYALURONIC ACID

Abstract (from WPI):

Supercapsulated strains of Streptococci producing hyaluronic acid (HA) with a mol.wt. exceeding 6 million are new. Also claimed is HA having a mol. wt. >6 million produced by a supercapsulated bacterial strain.

USE - The HA produced can be used in medical applications such as ophthalmology.

ADVANTAGE - The new supercapsulated bacterial strains are able to produce HA of much higher mol. wt. than previously achieved in bacterial systems.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-501128

(43) 公表日 平成10年(1998) 2月3日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 19/26		9637-4B	C 1 2 P 19/26
C 1 2 N 1/20		9735-4B	C 1 2 N 1/20
// C 0 8 B 37/08		7433-4C	C 0 8 B 37/08
(C 1 2 P 19/26			
C 1 2 R 1:46)			

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-500737  
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995) 5月24日  
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996) 11月26日  
 (86) 国際出願番号 P C T / S E 9 5 / 0 0 5 8 5  
 (87) 国際公開番号 W O 9 5 / 3 3 0 6 7  
 (87) 国際公開日 平成7年(1995) 12月7日  
 (31) 優先権主張番号 9 4 0 1 8 0 6 - 6  
 (32) 優先日 1994年5月26日  
 (33) 優先権主張国 スウェーデン (S E)

(71) 出願人 ファーマシア・アー・ペー  
 スウェーデン国、エス-171 97・ストツ  
 クホルム (番地なし)  
 (72) 発明者 ストール, ステン  
 スウェーデン国、エス-226 55・ルンド、  
 ルーデボクスベージェン・203  
 (74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒアルロン酸の生産方法及び手段

(57) 【要約】

ストレプトコッカスA群又はC群の超莢膜株及び分子量  
 が600万を超えるヒアルロン酸の生産のためのその使  
 用。

## 【特許請求の範囲】

1. 分子量が600万を超えるヒアルロン酸を生産するストレプトコッカスの超莢膜株。
2. ストレプトコッカスA群又はC群であることを特徴とする請求項1に記載の株。
3. パーコール勾配で $1.03\text{ g/cm}^3$ 以下の密度でバンドを形成することを特徴とする請求項1又は2に記載の株。
4. パーコール勾配で $1.02\text{--}1.03\text{ g/cm}^3$ の範囲の密度でバンドを形成することを特徴とする請求項3に記載の株。
5. 高分子量ヒアルロン酸の生産方法であって、
  - (i) 分子量が600万を超えるヒアルロン酸の生産能力を有するストレプトコッカスの超莢膜株を選別し、
  - (ii) リアクター中、温度 $30\sim 35^\circ\text{C}$ で、実質的にせん断力のない攪拌条件下、pHが $5.6\sim 6.2$ の範囲の培養培地で前記株を培養し、
  - (iii) 培養培地から段階(ii)で生成したHAを精製し、分子量が600万を超えるHAを得る、という各段階を含む方法。
6. 前記株がストレプトコッカスA群又はC群であることを特徴とする請求項5に記載の方法。
7. 前記超莢膜株が変異誘発によって得られたことを特徴とする請求項5又は6に記載の方法。
8. 超莢膜細菌株により生産される分子量が600万を超えるヒアルロン酸。

## 【発明の詳細な説明】

ヒアルロン酸の生産方法及び手段

本発明は、ストレプトコッカスの超莢膜株(superencapsulated strain)を使用する発酵による高分子量のヒアルロン酸の生産方法に関する。本発明はまた、超莢膜変異株の選別方法、上記のようなヒアルロン酸を高収量で生産する変異株に関する。

ヒアルロン酸(HA)即ちヒアルロナンは、交互に結合するD-グルクロン酸分子とN-アセチルグルコサミン分子の繰返し二糖類からなるグリコサミノグリカンである。これらの分子は $\beta(1, 3)$ -D結合によって結合し、グルクロン酸に対するグルコサミンの結合は $\beta(1, 4)$ -Dである。

ヒアルロン酸にはいくつかの源があり、その分子量は源によりかなり異なる。関節滑液で見出されるHAの分子量は約100~800万であり、ヒトの臍帯では分子量約360~450万であり、雄鶏とさかのHAは非常に大きい値、例えば1200~1400万まで又はもっと大きいこともあり得る。ヒアルロン酸の化学組成は、その源にかかわらず同一であり、ヒアルロン酸は非免疫原性であるので、医学においていくつかの適用がある(BrimacombeとWebber(1964))。HAの有効性は、分子量に相関する弾性特性

と粘性特性の独特の組合せの結果である。そのため、早くからできるだけ高分子量を得ることに関心があった。

それ故、文献には、非常に高分子量のHAの多数の例があるが、これらの値は、非常にしばしば源の原料に関する値である。しかし、雄鶏のとさかのような生物システムで生産されるHAは、タンパク質及び、例えばコンドロイチン硫酸などの他のグリコサミノグリカンに結合しているので、広範囲にわたって精製する必要があるということに注意すべきである。非常に高性能の精製及び滅菌方法が開発されたとしても、これらの工程で分子量が減少し、大部分の場合に、最終生成物の分子量がかなり小さいことは不可避である。

現在、市販の主要なHA製品は、分子量が約350万の

Healon<sup>®</sup> (ファルマシア A B、ウプサラ、スウェーデン) であ

る。この製品は、米国特許第4141973号の開示内容に基づく方法により雄鶏とさ  
かから調製される。同一源から、分子量約

500 万の H A 製品 Healon<sup>®</sup> G V (ファルマシア B) が調製され

る。これらの分子量は滅菌製品の分子量であり、このことは、滅菌工程前の製品  
は、それぞれの分子量が約500万、約700万であるに違いないことを意味する。

例えば眼科などのいくつかの医学的処置における H A の有用性が十分に証明さ  
れているにもかかわらず、高分子量の H A 製品はほとんど市販されていない。こ  
の理由の一つは、恐らくは上記の源、特に雄鶏とさかから H A の分子鎖をあまり  
に大きく分解させずに純品を得るために複雑な精製方法が必要だからである。そ  
れ故、よく制御され、簡単な精製方法が適用できる代替の源又は生産システムが  
必要である。

種々の細菌システムにおける H A 生産に関する多数の論文と特許出願が発行さ  
れてきた。H A のバイオテクノロジーによる生産における細菌の使用が、いくつ  
かの理由、即ち技術的、経済的、倫理的な理由から提唱されてきた。Streptococcus  
5種による生産が50年以上前から知られたが、開示されたシステムの大部分はス  
トレプトコッカスの A 群と C 群に関するようである。例えば、ヒトの病原体であ  
る Streptococcus pyogenes (A 群) の莢膜株 (Kendallら, (1937))、動物の病  
原体である Streptococcus equi と Streptococcus equisimilis (C 群) の莢膜株  
である。これらの病原体における主要な莢膜多糖としてのヒアルロン酸の合成は  
、宿主防御を逃れる一つの方法である (Robertsら (1989))。

細菌における H A 合成の生化学によると、今までに知られている限りは2つの  
遺伝子の作用がある。即ち、内在性膜タンパク質であるシンターゼをコードする  
Aであり、UDP-グルコースをUDP-グルクロン酸に変換するUDP-グル  
コースデヒドロゲナーゼをコードするBである。更に、UDP-グルコースはU

D P-N-アセチルグルコサミンに変換される必要がある。後者は細胞壁生合成に必要である (Doughertyと van de Rijn(1992, 1993)及び de Angelisら(1993)参照)。合成の制御、例えば何がH A合成を開始させ、何がH A合成を終了させるのかについてほとんど知られていない。しかし、合成の化学量論によりフィード(feed)と培地の組成のある種のガイドラインが与えられる。

細菌によるH A生産システムの開発に関する努力は、細菌の選別と適当な培養培地に集中してきた。莢膜中の実際の分子量はやや大きいかも知れないということが文献に記載されているけれども (van de Rijn(1983)参照)、莢膜野生型株は、発酵培養液に約500万を超える分子量のH Aを放出しないことは早くから明白であった。しかし、特許を含む文献と市販のサンプルから判断すると、細菌生産H Aの分子量は、現在雄鶏とさかか

ら生産されるものよりずっと小さい(上記参照)。文献に示される高分子量値(所望の結果を表す)と実際に得られた値にしばしば非常に明白な差があるということをも更に注意すべきである。

細菌システムで得られた最大値は約400万であるようである。例えば、米国特許第4784990号(Bio-Technology General)200~350万のH A、国際公開第9208799号(Fermentech)100~300万のH A、日本特許第2058502号(Chisso Corp)200~300万のH A、日本特許第63129991号と第63028398(電気化学工業(株))200~400万のH A、欧州特許第144019号(Miles Laboratories, Mobay Chemical Corp)200~400万のH Aを参照。

更に、上記の値は、滅菌されなかったH A産物に関するということを注意すべきである。それ故に、これらの原料は、滅菌後、上記のHealon<sup>®</sup>製品と同等の分子量を有するH A製品の製

造に使用できないことは明白である。

ストレプトコッカスの全ての株は耐気性嫌気性生物である。即ち、酸素の存在下で生育できるが、電子受容体として酸素を利用できない。それ故、空気的重要性に関する、先行論文と特

許における考察又は推測は、HA生産について決定的に重要なパラメーターを与えないように考えられる。

HA生産の適切な培地と条件は、生産に関する論文の大部分で考察されている。この分野の特許又は特許出願の更なる例として、日本特許第63141594号と第63123392号（電気化学工業(株)）、米国特許第4897349号（MedChem Products Inc）を挙げることができる。

上記の多数の刊行物にかかわらず、高分子量のHA産物のための有効な細菌による生産システムの必要性が依然としてある。この関連での“高分子量”は600万を超える値、特に800万を超える値、とりわけ900万を超える値又はより大きい値を意味

する。何故ならば、このような原料は、Healon<sup>®</sup>GV型製品の製造に適しているであろうからである。

本発明者は今や、高分子量のHAがストレプトコッカスの超莢膜変異株により生産されることを発見した。本発明の一面は、発酵システムにおける上記のような株の使用であり、次に精製して、分子量が600万を超える、特に800又は900万を超えるHAを得ることである。

本発明の別の一面は、適切な超莢膜細菌株の調製と選別である。

実験は主に、寒天プレートでムコイドコロニーを形成し、液体培地でHAを生産する野生型 S. equi ss. equi CCUG 22971 に基づいた。この種から、無莢膜対照変異株と超莢膜変異株を得た。パーコール勾配で、無莢膜変異株は密度  $1.09 \text{ g/cm}^3$ 、ムコイド野生型は密度  $1.05 \text{ g/cm}^3$ 、超莢膜株は密度  $1.03 \text{ g/cm}^3$  未満、より正確には約  $1.03\text{--}1.02 \text{ g/cm}^3$  でバンドを形成した（明細書の実験の部分を参照）。

本発明で使用する細菌株はストレプトコッカスであり、特にA群及びC群のストレプトコッカスであり、更に特に、最適条件下での生育中の細胞の位相差顕微鏡とインジアインク染色から判断して莢膜野生型株の大きさの少なくとも約2倍

の莢膜を有する超莢膜種であって、密度 $1.03\text{ g/cm}^3$ 以下、例えば $1.02\text{--}1.03\text{ g/cm}^3$ の範囲でバンドを形成し、600万を超える、特に800万を超える又は最も好ましくは900万を超える分子量のHAを生産するStreptococcus equi ss equiの変異株である。

該細菌株の生産方法は、ランスフィールドのC群ストレプトコッカスの野生型株、例えば現在最も好ましい株、S. equi ss equi CCUG 22971などの細菌株を変異誘発させ、特に固体

培地で化学変異誘発させる段階を含む。この方法は、液体培地でのより煩わしい変異誘発方法を避け、莢膜はまた変異原性で毒性の化学物質に対して保護するという点で超ムコイドコロニーの生育を促進し、密度勾配中での超莢膜細胞のより小さい密度によって密度勾配において最終的に富化(enrichment)及び選別を促進する。

Streptococcus equiは、いくつかの他の化膿性で溶血性のストレプトコッカスと共に現在分類されるウマの病原菌であり、ランスフィールドC群に属する。ヒト又は動物に病原性の他のC群ストレプトコッカスは、主に炭水化物発酵パターンからS. equisimilis又はS. zooepidemicusとして分類されている。これらの株の分類学的関係は、今まで満足のいくように研究されなかった。それらは、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology第1版でタクソンStreptococcus種として分類されただけである。対照的に、S. dysgalactiaeは $\alpha$ -溶血性であり、正当な種として認められた。それは、S. equisimilisと最も関係が深い可能性がある。S. zooepidemicusはS. equiの亜種ということがまた提案された。それ故、Streptococcus equiはS. equi ss equiと命名されるべきである。

HAの生産方法は以下の段階を含む。(i) 600万を超える、特に800又は900万を超える分子量のHAを生産する能力を有する超莢膜ストレプトコッカス株を選別する段階、(ii) 温度 $35^\circ\text{C}$ 以下、好ましくは $30\text{--}35^\circ\text{C}$ の範囲で、特に $31\text{--}33^\circ\text{C}$ で、pH値約6.2以下、例えば $5.6\text{--}6.2$ 、好ましくは $5.80\text{--}5.95$ の範囲で適切な培地の存在下、バイオリアクターで該株を培養する段階、(iii) 粗混合物か



ら生成物を精製する段階。

使用する培地は、ヒアルロン酸の連続的合成を可能としないといけないし、細胞の生育速度を最適化しようと試みるならば現れる非莢膜細胞を選別してはいけない。培地は、鉄及び銅イオンなどのHAの分解を促進するいずれの金属イオンを含むべきでないし、リアクターから放出させるべきでない。

一般的に、培地の組成は2つの必要条件を満たすべきである。即ち、(i) ストレプトコッカスの細胞の構築のために基本元素(C, N, O, H, P, S)と必要な生長因子を正しい割合で供給すること、及び(ii) 十分な量と正しい割合でHA合成のための元素と化合物を供給すること。フィード(feed)の組成も必要条件(ii)を満たすべきである。生育培地の組成は微生物細胞の組成から、フィード組成はHA合成の化学量論から計

算された。発酵槽培養の基本的液体培地を表Iに示す(下記の実験部分も参照)。

表 I. カザミノ酸をベースとする培地の組成			
成分	濃度 (g/l)	標準	範囲
バクトビタミンアッセイ		12	
カザミノ酸			
バクト酵母エキス		3	±1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		3	<+11 <sup>a</sup>
トリプトファン		0.4	
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O		0.25	
MnCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O		0.05	
NaHCO <sub>3</sub>		2	0-2 <sup>*</sup>
糖	グルコース	16	±4 <sup>a</sup>
添加物		特記	

\* 所望のpH値による

リアクターには、広範囲の乱流を起すいかなる型のバッフルも内部構成部材も装着させるべきでないし、攪拌は、例えば、せん断力を発生させないでよく混合できる気体上昇又は他のタイプの回転翼(imPELLer)によって非常に温和な方法でされねばならない。このことは、非常に高い分子量を得るために決定的に重要

であるが、米国特許第4784990号での勧告“強く攪拌しながらストレプトコッカス属の微生物を生育させること……”

に反している。

種々の代替の培養法を試験し、例えばバッチ培養、流加培養、半連続流加培養、連続培養が有効であることが知見された。

#### 培地

使用した標準寒天プレートはBlood Agar, B A (the Central Bacteriological Laboratory, L Uにおいてウマ血液から調製)、Bacto Todd Hewitt Agar, T H A (Difco)、及びバクトトリプトン (Difco) 10 g / l、バクト酵母エキス (Difco) 1 g / l、リン酸水素二ナトリウム (Merck, PA) 1.6 g / l、炭酸水素ナトリウム (Merck, PA) 2 g / l、硫酸マグネシウム (Merck, PA) 0.1 g / l、バクトアガー (Difco) 20 g / l、スクロース (BDH) 8 g / l から作製された T Y S A であった。初めの試験用の液体培地は、上記のバクト酵母エキスを補充した Todd Hewitt Broth (Difco) であった。

#### 変異誘発

ニトロソグアニジン (Sigma) による化学変異誘発 (Cerde Olmedo IE及びHarwalt PC(1968)) を使用した。野生型株を T Y S A プレートに塗り広げた。ニトロソグアニジンの数個の結晶を中心に置いた。インキュベーション後、透明な阻害ゾーン

がニトロソグアニジンの結晶のまわりで明白であった。ゾーンの端に近接しているところで生育しているムコイドコロニーを選別し、それについて更なる試験を行なった。

#### 勾配遠心分離

T H B 中での生育後、該生物を遠心分離で回収し、0.15M塩化ナトリウムで一度洗浄し、塩化ナトリウムに再懸濁した。0.15M塩化ナトリウム中の25-50%パーコール10mlを固定型アングルローターで15000g<sub>av</sub>、4℃で30分間遠心して、パーコール勾配を予め形成した。密度マーカービース (Pharmacia LKB Biotechnol

ogy AB, ウプサラ、スウェーデン) を内部密度値標準として加えた。細胞懸濁液  $50\mu\text{l}$  を予め形成された勾配液の各々に加え、その後スイングローターで  $5000\sim 16000g_v$ 、 $4^\circ\text{C}$  で20分間遠心した (Percoll: Methodology and applications, Pharmacia Laboratory Separation Division)。

#### HA 分子量の評価

ルーチンに使用した方法の一つは、雄鶏とさかから調製した種々の分子量の HA 参照品 (Pharmacia Ophthalmics) を使用する比較電気泳動を含む。約  $1.1\sim 1.2\text{mg}/\text{ml}$  含むように参照品を希釈し、フリーザー中に  $-20^\circ\text{C}$  で保存した。0.7-0.9% アガロ

ースを使用して、ゲルを作製した。緩衝液はリン酸-EDTA ( $2000\text{ml}$ 、10倍濃縮液は  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  57.5 g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  13.1 g、 $\text{Na}_2\text{EDTA}$  3.7 gを含む) であった。参照品とサンプルをプロモフェノールブルー/グリセロールと混合し、ゲルにかけた。20mAの一定電流で、サンプルをウェルからゲルに進入させ、その後約20時間、30Vの一定電圧をかけて、ゲル電気泳動を行った。最後にゲルをトルイジンブルーO溶液 (0.4%) で30分間染色した。ゲルを3% HAcで15分間、1% HAcで15分間 (3~4回) 脱色した。

使用した別の方法はSEC-Lalls (サイズ排除クロマトグラフィー-低アングルレーザー光散乱) であった。約600万まで上記2つの方法でよく一致し、より大きい値では変動は約10%であった。

#### 超莢膜株

高分子量ヒアルロン酸の生産に好ましいシステムを選別するために、上記の段階を含む多数の一連の実験を行ない、基本的段階は超莢膜化する必要のある細菌の選別であることが知見された。この特徴は勿論種々のパラメーターを使用して記載できるが、本発明者らは、本発明の株の定義として選別株がバンド

を形成する密度値を使用することに決めた。上記のように該株は密度  $1.03\text{ g}/\text{cm}^3$  以下、例えば  $1.02\sim 1.03\text{ g}/\text{cm}^3$  の範囲でバンドを形成する。勿論この定義は、密度勾配遠心分離以外の方法を株の選別のために使用する場合にも有効である。

超莢膜株はまた、高度にムコイド性のコロニー形態を有する。8 g / l スクロースを含む T Y S A に塗布したときは、非常に大きな (直径  $>> 5 \text{ mm}$ ) ねばねばしたコロニーが生育する。位相差顕微鏡で測定すると、莢膜の厚さは、莢膜株よりも超莢膜株の場合にずっと大きい。細胞の直径は  $1.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$  であるが、莢膜の直径は  $>> 4 \mu\text{m}$  である。以下で更に考察する 2 つの超莢膜株である H 22 とその誘導株 H 22 N O は両方とも非溶血性であり、それぞれ約 750 万と約 950 万までの分子量の H A を生産することが知見された。

本発明の超莢膜化は更に、細胞丸ごとの近赤外スペクトルの多変量データ解析で測定できる。本方法のサンプルの解析は周知の技術であり、例えば Jolliffe I T (1986)、Massart ら (1990)、Box ら (1978)、Mark 及び Workman (1991)、Marshall 及び Verdun (1990)、Kalias 及び Lang (1994) を参照されたい。

#### 第 1 主要コンポーネント (the first Principal component)

(PC1) は莢膜化の程度に関連する。C C U G 23255、C C U G 27365、C C U G 27366 (ここでは参照株という) などの弱莢膜株で測定した第 1 主要コンポーネントと比較して、超莢膜株は、0.4 以上、好ましくは 0.5 より大、特に 0.7 より大の第 1 主要コンポーネントを有する。この主要コンポーネントの絶対値は株のタイプに依存する。試験すると、変異株 H 22 (下記) は第 1 主要コンポーネント  $0.3 \pm 0.1$  を有し、H 22 N O の対応値は  $+0.4 \pm 0.05$  であった。同一の実験条件下、参照株の PC1 値は  $-0.2 \sim -0.3$  であった。

サンプル調製は、37℃ で血液寒天での生育、数個のコロニーの 0.9% N a C l 1.5 ml への溶解、その後、細胞懸濁液  $100 \mu\text{l}$  を対物レンズ上で  $25 \times 25 \text{ mm}$  に広げ、クリーンベンチで乾燥することを含む。N I R スペクトルは、InfraAlyzer 500、Bran & Luebbe を使用して反射率モード (1100–2500 nm) で集めた。

#### 実施例 1

超莢膜変異株 S. equi ss equi H 22 株を、大きな表面積をもつ改変回転翼を装えた Braun Melsungen 発酵槽中の培地 1000 ml 容量での流加培養で培養した。培養温度は 33℃ で、炭酸ナトリウム溶液の添加により p H を 6.0 に維持した。対数期の初め

(4時間目)にフィードを開始し、3時間続けた。フィード速度は希釈速度  $D = 0.02 \text{ h}^{-1}$  に対応した。このフィード速度は、他の実験で知見された最大分子量のためには最適ではない。培地組成は上記表 I のものであった。フィードはスクロース  $25 \text{ g/l}$ 、グルコース  $10 \text{ g/l}$ 、マンノース  $0.1 \text{ g/l}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $3 \text{ g/l}$ 、酵母エキス  $4 \text{ g/l}$  を含んでいた。

表 II. H 22 株の流加培養の結果					
時間 (h)	OD <sub>620</sub>	莢膜	分子量 ( $10^{-6}$ )		HA 濃度 (mg/l)
			E-fores	SEC-LALLS	
0	0.146	-ND	ND	ND	ND
4	0.409	++	ND	ND	ND
7	0.87	+++	6.8	7.1	226
12	1.13	++	6.8	7.1	376
14	1.15	++	6.8	7.4	416
24	1.11	(+)	6.3	7.5	390
26	1.10	-	6.5	6.4	316

ND=測定せず

## 実施例 2

S. equi ss equi H 22 株を、以下のトリプトンをベースとした培地 (濃度  $\text{g/l}$ ) を用いて、温度  $37^\circ\text{C}$  で空気上昇型リアク

ターで培養した。

トリプトン	8
酵母エキス	3
NaCl	2
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	3
$\text{MgCl}_2$	0.25
$\text{MnCl}_2$	0.12
$\text{NaHCO}_3$	2
グルコース	12

生育が始まった時、以下の組成物（濃度 g/l）の“フィード”を加えた：酵母エキス(3)、トリプトン(8)、 $K_2HPO_4$ (5)、スクロース(350)。

フィード容量は1100mlで、それを10時間で加えた。リアクターの操作容量は4500mlで、それをレベルチューブ(level tube)に連結し高速で作動するポンプにより一定に維持した。半連続培養操作の時間中、2M  $Na_2CO_3$ の添加によりpH値を7.1に保った。それから空気を止め、主にHA分解をモニターするために、リアクター中の変化を更に24.5時間追跡した。最も興味深いパラメーターの解析により、次の結果を得た。

分子量 (MDa)	6.3 (最大値)
分解速度 (MDa/h)	0 (フィードフェーズ)
	0.019 (後期)
粘度 (12時間目)	1.504
HA含量 (mg/l)	800 (最大値)

それ故、フィード速度もpHも、高分子量生成に最適ではなかったけれども、分子量は600万を超えた。

### 実施例3：超英膜株H<sup>22</sup>NOの連続培養研究

本実験では、温度33℃、pH6.0、一定の希釈速度 $0.10h^{-1}$ を使用した。本実験で使用した、各種の定常状態での培地を以下のように変化させた。

S.S. No.	グルコース (g/l)	リン酸 (g/l)	PO <sub>4</sub> /グルコース (g/l)	酵母エキス (g/l)	酵母エキス/ グルコース (mg/l)	添加物 (mg/l)
1	16	3.2	0.2	2.4	0.15	-
2	16	6.4	0.4	2.4	0.15	-
3	16	6.4	0.4	2.4	0.15	UDF(10)
4	16	8	0.5	2.4	0.15	-
5	20	8	0.4	2.4	0.12	-
6	20	8	0.4	2.4	0.12	RIB(2)

連続培養の結果は次の通りであった。

S.s. NU no.	OD	TS (g/l)	分子量 (MDa)	HA- 濃度 (mg/l)	S <sub>out</sub> (g/l)
1 240	1.36	14.1	7.7	142	0.29
2 228	1.30	15.1	8.7*	109	0.29
3 208	1.20	15.4	9.1	124	0.26
4 224	1.40	17.4	9.1	145	0.28
5 288	2.45	18.6	7.1	145	0.28
6 292	3.31		7.0	159	0.29

\* この定常状態からの広範囲にわたって精製された  
サンプルの分子量はLallsの方法で6.1であった。

各種の定常状態の分子量は大きく、最大値は9.1MDaであったことが結果から明白である。この特定例の収量はかなり小さかったが、他の一連の実験では、最高約350mg/lが達成された。リン酸レベルを増加させてもより高収量は得られないが、代わりに分子量の増加が観察される。このことは、収量と分子量の間に逆の関係がしばしばあるという知見を証明している。

培養の1週間の間、該株は安定に非溶血性であった。

新規超英膜株が、以前に細菌システムで達成されたものよりずっと大きい分子量のHAを生産できることは、上記の実験から明白である。それ故、HA生産の非常に有望な道具が開発された。

## 参考文献

de Angelis PL, Papaconstatinou J and Weigel (1993), J Biol Chem 268:19181-19184.

Box GEP et al (1978), Statistics for Experimenters, J.Wiley & Sons, ISBN 0-471-09315-7

Brimacombe JS and Webber JM (1964), Mucopolysaccharides, pp 41-49, Elsevier, New York.

Cerda-Olmedo IE and Hanwalt PC (1968), J Mol Biol 33:705.

Dougherty BA and van de Rijn (1992), J Exp Med 175:1291-1299.

Dougherty BA and van de Rijn (1993), J Biol Chem 268:7118-7124

Jolliffe IT (1986), Principal component analysis, Springer Verlag, New York

Kalivas JH and Lang PM (1994), Mathematical analysis of spectral orthogonality, Marcel Dekker Inc, ISBN 0-8247-9155-X

Kendall F, Heidelberger M, and Dawson M (1937), J Biol Chem 118:61-69

Mark H and Workman J (1991), Statistics in Spectroscopy, Academic Press

Marshall AG and Verdun FR (1990), Fourier Transforms in NMR, Optical and Mass Spectrometry, Elsevier, ISBN 0444-87412-7

Massart et al (1990), Chemometrics: A Textbook (third ed.), Elsevier, ISBN 0-444-42660-4

Roberts IS, Saunders FK and Boulnois GJ (1989), Biochem Soc Trans 17:462-464.



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 95/00585

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC6: C12P 19/26, C12N 1/20 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC6: C12P, C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
MEDLINE, CA, WPIDS, IFIPAT		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4517295 A (JAMES W. BRACKE ET AL), 14 May 1985 (14.05.85), see claims and column 4, lines 64 - 68 --	1-2,5-8
X	CA 1328841 A (BROWN, KAREN K. ET AL), 26 April 1994 (26.04.94), see claim 11 --	1-2,5-8
X	US 4782046 A (KAREN K. BROWN ET AL), 1 November 1988 (01.11.88), see claims -- -----	1-2,5-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
21 Sept 1995		22-09-1995
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Carolina Gómez Lagerlöf Telephone No. +46 8 782 25 00

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/SE 95/00585

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A- 4517295	14/05/85	AU-B- 556730	13/11/86
		AU-A- 2076883	10/09/84
		CA-A- 1212645	14/10/86
		EP-A,B- 0137786	24/04/85
		SE-T3- 0137786	
		WO-A- 8403302	30/08/84
CA-A- 1328841	26/04/94	NONE	
US-A- 4782046	01/11/88	AU-B- 573768	23/06/88
		AU-A- 3580684	30/05/85
		CA-A- 1270219	12/06/90
		EP-A,A,A 0144019	12/06/85
		SE-T3- 0144019	
		JP-A- 60133894	17/07/85
		US-A- 5316926	31/05/94

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE 95/00585

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-2  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Molecular weight is not an acceptable distinguishing feature as it only defines the problem but not the solution. The wording "supercapsulated" has only been shown to solve the problem in certain cases but not that the feature itself is the solution. The consideration on inventive step given is based on the claims, not being clear and concise.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>                      識別記号      庁内整理番号                      F I

(C 1 2 N    1/20

C 1 2 R    1:46)

(81)指定国                      EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
C, NL, PT, SE), AM, AU, BB, BG, B  
R, BY, CA, CH, CN, CZ, EE, FI, GE  
, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK,  
LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, N  
O, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ  
, TT, UA, US, UZ, VN